



# ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

A-1200 Wien, Dresdner Straße 87

Kanzleigeühr € 47,00  
Schriftengebühr € 169,00

Aktenzeichen **A 1377/99**

Das Österreichische Patentamt bestätigt, dass

**die Firma BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT  
in A-1221 Wien, Industriestraße 67,**

am **10. August 1999** eine Patentanmeldung betreffend

**"Faktor X-Analogon mit verbesserter Aktivierbarkeit",**

überreicht hat und dass die beigeheftete Beschreibung samt Zeichnungen mit der ursprünglichen, zugleich mit dieser Patentanmeldung überreichten Beschreibung samt Zeichnungen übereinstimmt.

Österreichisches Patentamt  
Wien, am 12. September 2003

Der Präsident:



**HRNCIR**  
Fachoberinspektor





2017年12月  
第12期



A 1377/99-1

R 35857

(51) Int. Cl. :

Urtext

AT PATENTSCHRIFT

(11) Nr.

(73) Patentinhaber: BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT  
Wien (AT)

(54) Gegenstand : Faktor X-Analogon mit verbesserter  
Aktivierbarkeit

(61) Zusatz zu Patent Nr.

(67) Umwandlung aus GM

(62) Ausscheidung aus :

(22) (21) Angemeldet am: 10. AUG. 1999

(33) (32) (31) Unionspriorität :

(42) Beginn der Patentdauer:

Längste mögliche Dauer:

(45) Ausgegeben am :

(72) Erfinder :

(60) Abhängigkeit:

(56) Entgegenhaltungen, die für die Beurteilung der Patentierbarkeit in Betracht gezogen wurden:

1/1

Die Erfindung betrifft Faktor X-Analoga mit verbesserter Aktivierbarkeit mit einer Substitution im Bereich des Aktivierungspeptids, eine Präparation enthaltend die erfindungsgemäßen Faktor X-Analoga sowie ein Verfahren zur Herstellung von einzelkettigen und zweikettigen Faktor X-Analoga.

Nach Initiierung des Blutgerinnungsprozesses verläuft die Gerinnungskaskade durch die sequentielle Aktivierung von verschiedenen Proenzymen (Zymogenen) im Blut in ihre aktive Formen, den Serinproteasen. Dazu gehören u.a. Faktor XII/XIIa, Faktor XI/XIa, Faktor IX/IXa, Faktor X/Xa, Faktor VII/VIIa und Prothrombin/Thrombin. Die meisten dieser Enzyme sind im physiologischen Zustand nur aktiv, wenn sie in einem Komplex an einer Membranoberfläche assoziiert sind. Ca-Ionen sind in viele dieser Prozesse involviert. Die Blutgerinnung folgt entweder dem intrinsischen Weg, bei dem alle Proteinkomponenten im Blut vorhanden sind, oder dem extrinsischen Weg, bei dem der Zellmembrangewebefaktor eine kritische Rolle spielt. Der Wundverschluß erfolgt schließlich durch die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin durch Thrombin.

Der Prothrombinase-Komplex ist verantwortlich für die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin. Thrombin ist ein wichtiges Enzym, das sowohl als Prokoagulant als auch als Antikoagulant wirken kann. Der Prothrombinase-Komplex, an dem u.a. Faktor Va (als Cofaktor) und Faktor Xa (als Serinprotease) beteiligt sind, assembliert in einer Ca-abhängigen Assoziation an der Oberfläche von Phospholipiden. Es wird diskutiert, daß dabei die katalytische Komponente des Prothrombinase-Komplexes Faktor Xa ist.

Faktor X (Stuart/Prower-Faktor) ist ein Vitamin K-abhängiges Koagulationsglykoprotein, das in der intrinsischen und extrinsischen Blutgerinnungskaskade beteiligt ist. Das primäre Translationsprodukt von Faktor X (pre-pro-FX) besitzt 488 Aminosäuren und wird von der Leber oder humanen Hepatoma-Zellen zunächst als einzelkettiges 75 kD Vorläuferprotein synthetisiert. Im Plasma liegt Faktor X weitgehend als zweikettiges Molekül vor (Fair et al. 1984. Blood 64:194-204).

Während der Biosynthese wird nach Abspaltung der pre-Sequenz durch eine Signalpeptidase (zwischen Ser23/Leu24) und des Pro-peptides (zwischen Arg40/Ala41) das einzelkettige Faktor X-Molekül durch Prozessierung und Deletion des Tripeptides Arg180-Lys181-Arg-182 in die zweikettige Form, bestehend aus der ca. 22 kD leichten Kette und der ca. 50 kD schweren Kette, die miteinander über eine Disulfid-Brücke verbunden sind, gespalten (Figur 1). Faktor X zirkuliert im Plasma daher als zweikettiges Molekül.

Während des Blutgerinnungsprozesses wird Faktor X vom inaktiven Zymogen zur aktiven Protease Faktor Xa durch limitierte Proteolyse konvertiert, wobei die Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa in einem von 2 membrangebundenen Komplexen erfolgen kann: dem extrinsischen Faktor VIIa/Gewebefaktor-Komplex oder dem intrinsischen Faktor VIIIa-Faktor IXa-Phospholipid-Ca-Komplex oder „Tenase-Komplex“ (Mertens et al. 1980. Biochem. J. 185:647-658). Eine proteolytische Spaltung zwischen Aminosäuren Arg 234/Ile 235 führt zur Freisetzung eines 52 Aminosäuren langen Aktivierungspeptids vom N-Terminus der schweren Kette und damit zur Bildung des aktiven Enzyms, Faktor Xa. Das katalytische Zentrum des Faktor Xa ist auf der schweren Kette lokalisiert.

Die Aktivierung über den Faktor VIIa-TF(extrinsischen)-Komplex führt zur Bildung von Faktor Xa $\alpha$  (35 kD) und Faktor Xa $\beta$  (31 kD), wobei bei geringen Konzentrationen von Faktor VIIa im Komplex auch ein Polypeptid von 42 (kD) auftritt.

Die Bildung von Faktor Xa $\alpha$  erfolgt über eine Spaltung bei Arg234/Ile 235 der schweren Kette und repräsentiert die Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa. Das Auftreten von Faktor Xa $\beta$  resultiert vermutlich aus einer autokatalytischen Spaltung bei Arg469/Gly470 im C-Terminus der schweren Kette von Faktor Xa $\alpha$  und der Abspaltung eines 4.5 kD-Peptides. Faktor Xa $\beta$  besitzt ebenfalls wie Faktor Xa $\alpha$  katalytische Aktivität. Es wurde jedoch gezeigt, daß durch die Spaltung von Faktor Xa $\alpha$  zu Faktor Xa $\beta$  eine Plasminogen-Rezeptorbindungsstelle entsteht und Faktor Xa $\beta$  gegebenenfalls fibrinolytische Aktivität aufweist bzw. an Fibrinolyse als Cofaktor beteiligt ist. Die Umwandlung von Faktor Xa $\alpha$

zu Faktor Xa $\beta$  ist jedoch langsamer als die Bildung von Thrombin, wodurch eine Initiierung der Fibrinolyse vor Ausbildung eines Blutklots verhindert wird (Pryzdial et al. 1996. J. Biol. Chem. 271:16614-16620; Pryzdial et al. 1996. J. Biol. Chem. 271:16621-16626).

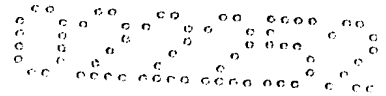
Das 42 kD-Polypeptid resultiert aus einer Prozessierung im C-Terminus der schweren Kette zwischen Arg469/Gly470 ohne vorherige Prozessierung zwischen Arg234/Ile 235. Dieses Intermediat besitzt ebenso wie ein Faktor Xa $\gamma$ -Fragment, das durch Proteolyse bei Lys370 entsteht, keine katalytische Aktivität (Mertens et al. 1980. Biochem. J. 185:647-658; Pryzdial et al. 1996. J. Biol. Chem. 271:16614-16620).

Die Aktivierung von Faktor X im intrinsischen Weg wird katalysiert durch den Faktor IXa-Faktor VIIId-Komplex. Während der Aktivierung werden die gleichen Prozessierungsprodukte erhalten, jedoch wird das Faktor Xa $\beta$ -Produkt in einem höheren Ausmaß erhalten als andere Faktor X-Prozessierungsprodukte (Jesty et al. 1974. J. Biol. Chem. 249:5614).

In vitro kann Faktor X beispielsweise durch Russell's Viper Venom (RVV) oder Trypsin (Bajaj et al. 1973. J. Biol. Chem. 248:7729-7741) oder gereinigte physiologische Aktivatoren, wie FVIIa/TF-Komplex oder Faktor IXa/Faktor VIIId-Komplex aktiviert werden (Mertens et al. 1980. Biochem. J. 185:647-658).

Kommerziell erhältliche Faktor X-Produkte aus Plasma enthalten zumeist eine Mischung aus Faktor Xa $\alpha$  und Faktor Xa $\beta$ , da nach Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa in erster Linie Faktor Xa $\alpha$  entsteht, der in einem autokatalytischen Prozeß wiederum zu Faktor Xa $\beta$  gespalten wird.

Um ein einheitliches Faktor Xa-Produkt mit hoher molekularer Integrität herzustellen, wurde in der EP 0 651 054 vorgeschlagen, Faktor X mit RVV über einen längeren Zeitraum zu aktivieren, so daß das resultierende Endprodukt im wesentlichen Faktor Xa $\beta$  enthielt. Sowohl die Nebenprodukte, beispielsweise Faktor Xa $\alpha$ , als



auch die Protease wurden anschließend durch mehrere chromatographische Schritte entfernt.

Die cDNA für Faktor X wurde isoliert und charakterisiert (Leytus et al. 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3699-3702; Fung et al. 1985. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3591-3595).

Humaner Faktor X wurde *in vitro* in verschiedenen Zelltypen, wie humanen embryonalen Nierenzellen oder CHO-Zellen exprimiert (Wolf et al. 1991. J. Biol.Chem. 266:13726-13730). Es wurde jedoch festgestellt, daß bei der rekombinanten Expression von humanem Faktor X die Prozessierung an Position Arg40/Ala41 im Gegensatz zur *in vivo* Situation ineffizient erfolgt und unterschiedliche N-Termini an der leichten Kette von Faktor X entstehen (Wolf et al. 1991. J. Biol.Chem. 266:13726-13730). Rekombinanter Faktor X (rFX) wurde durch RVV *in vitro* zu rFaktor Xa (rFXa) aktiviert oder rFXa direkt exprimiert, wobei das Aktivierungspeptid von Aminosäure 183 bis Aminosäure 234 deletiert und durch ein Tripeptid ersetzt wurde, um eine Prozessierung unmittelbar in eine zweikettige rFXa Form zu ermöglichen. Gereinigter rFX wurde zu etwa 70% in leichte und schwere Kette prozessiert, während die verbleibenden 30% einzelkettigen rFX mit 75 kD darstellten. Direkte Expression von rFXa führte zwar zur Bildung von aktivem Faktor Xa, jedoch auch zu inaktiven Intermediaten. Wolf et al. (1991. J. Biol.Chem. 266:13726-13730) stellten weiterhin eine verringerte Aktivität von rekombinantem Faktor X fest, die sie auf die schlechtere Aktivierbarkeit des rFX durch RVV sowie auf die inaktive Population an Proteinen und Polypeptiden des einzelkettigen Vorläufermoleküls zurückführten. Insbesondere fanden sie eine hohe Instabilität von rFXa bei Expression durch rekombinante Zellen, was sie auf die hohe Autoproteolyse rate zurückführten.

In der WO 98/38317 werden Faktor X-Analoga beschrieben, bei denen die Aminosäuren im Bereich zwischen Glu228 und Arg234 modifiziert sein können, wodurch diese Konstrukte beispielsweise durch Proteasen wie Furin aktiviert werden können.

Um die Funktion des C-terminalen Peptides von Faktor Xa zu untersuchen, führten Eby et al. (1992. Blood 80 (Suppl. 1): 1214

A) ein Stopcodon an Position Gly430 der Faktor X-Sequenz ein. Sie fanden jedoch keinen Unterschied zwischen der Aktivierungsrate von Faktor Xa (FXa $\alpha$ ) mit  $\beta$ -Peptid oder einer Deletionsmutante ohne  $\beta$ -Peptid (FXa $\beta$ ).

Faktor Xa ist ein wichtiger Bestandteil des Prothrombinase-Komplexes und findet daher Einsatz bei der schnellen Stillung von Blutungen und bei Patienten mit Störungen der Blutgerinnung, beispielsweise bei Hämophilie. Insbesondere die Behandlung von Hämophilie-Patienten mit Faktor VIII- oder Faktor IX-Defizienz mit Faktoren-Konzentraten, hergestellt aus Plasma, wird bei längeren Therapiezeiten oft dadurch kompliziert, daß inhibitorische Antikörper gegen diese Faktoren gebildet werden. Es wurden daher eine Reihe von Alternativen entwickelt, um Hämophilie-Patienten mit Faktoren mit einer By-pass-Aktivität zu behandeln. So wurde die Verwendung von Prothrombin-Komplex-Konzentrat, partiell aktiviertem Prothrombinase-Komplex (APPC), Faktor VIIa oder FEIBA vorgeschlagen. Kommerzielle Präparate mit Faktor VIII-Bypass-Aktivität (FEIBA) sind beispielsweise FEIBA® oder Autoplex®. FEIBA etwa enthält vergleichbare Einheiten an Faktor II, Faktor VII, Faktor IX, Faktor X und FEIBA, geringe Mengen an Faktor VIII und Faktor V, sowie Spuren von aktivierten Koagulationsfaktoren, wie Thrombin und Faktor Xa bzw. einen Faktor mit Faktor X-ähnlicher Aktivität (Elsinger 1982. Activated Prothrombin Complex Concentrates. Ed. Mariani, Russo, Mandelli, p.77-87). Elsinger weist insbesondere auf die Bedeutung einer „Faktor Xa-like“-Aktivität in FEIBA hin. Faktor VIII-Bypass-Aktivität wurde von Giles et al. (1988. British J. Haematology 9:491-497) für eine Kombination von gereinigtem Faktor Xa und Phospholipiden im Tiermodell gezeigt.

Es besteht daher ein großer Bedarf und eine Reihe von verschiedenen Anwendungsgebieten für Faktor X/Xa oder Faktor X/Xa-ähnlichen Proteinen entweder allein oder als Bestandteil eines Koagulationskomplexes in der Blutstillungstherapie. Die Halbwertszeit von Faktor Xa ist gegenüber dem Zymogen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* stark herabgesetzt. So kann etwa Faktor X in Glycerin 18 Monate stabil aufbewahrt werden, während Faktor Xa unter gleichen Bedingungen nur 5 Monate stabil ist (Bajaj et al.



1973. J. Biol. Chem. 248:7729-2241) bzw. in Glycerin bei 4°C nach 8 Monaten eine Reduktion der Aktivität um mehr als 60% zeigt (Teng et al. 1981. Thrombosis Res. 22: 213-220). Die Halbwertszeit von Faktor Xa beträgt lediglich 30 Sekunden im Serum.

Aufgrund der Instabilität von Faktor Xa wurde vorgeschlagen, Faktor X-Präparate zu verabreichen (US 4,501,731). Bei lebensbedrohenden Blutungen, insbesondere bei Hämophilie-Patienten, ist jedoch eine Verabreichung von Faktor X wirkungslos, da durch das Fehlen des funktionellen „Tenase-Komplexes“ im intrinsischen Blutgerinnungsweg keine ausreichende Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa erfolgen kann und die Aktivierung über den extrinsischen Weg oftmals zu langsam erfolgt, um eine rasche Wirkung zu erzielen. Zudem ist bei Hämophilie-Patienten ausreichend Faktor X vorhanden, der jedoch im Vergleich zu Faktor Xa eine 1000fach geringere Prothrombinase-Aktivität besitzt. In solchen Fällen ist es erforderlich aktivierten Faktor Xa direkt, gegebenenfalls zusammen mit Phospholipiden, wie bei Giles et al. (1988. British J. Haematology 9:491-497) beschrieben oder mit anderen Koagulationsfaktoren etwa mit Faktor VIII By-pass-Aktivität, zu verabreichen.

Bei der Herstellung von Faktor Xa aus Faktor X erfolgte die Aktivierung bisher zumeist über unphysiologische Aktivatoren tierischen Ursprungs, wie RVV oder Trypsin, wobei jedoch absolut sichergestellt sein mußte, daß das Endprodukt vollständig frei von diesen Proteasen ist. Wie oben schon erwähnt, werden bei der Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa eine Vielzahl teilweise auch inaktiver Intermediate gebildet (Bajaj et al. 1973. J. Biochem. 248:7729-7741, Mertens et al. 1980. Biochem. J. 185: 647-658). Die Anwesenheit solcher Intermediate führt zu einer Erniedrigung der spezifischen Aktivität des Produktes und gegebenenfalls auch zu solchen Intermediaten, die als Antagonisten der aktiven Serinprotease fungieren können. Zur Herstellung eines einheitlichen, reinen Produktes mit hoher spezifischer Aktivität sind daher bei konventionellen Methoden aufwendige Verfahren zur Aktivierung sowie zur chromatographischen Reinigung erforderlich.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher eine Präparation zur Verfügung zu stellen, die ein Polypeptid mit Faktor X/Xa-Aktivität enthält, das eine gegenüber dem Stand der Technik verbesserte Aktivierbarkeit durch Faktor XIa oder einem Derivat davon aufweist, das eine hohe Stabilität aufweist und das durch Faktor XIa oder einem Derivat davon, ohne die Verwendung einer der im Stand der Technik zur Aktivierung des natürlichen Faktor X bekannten Proteasen, insbesondere tierischen Ursprungs, wie beispielsweise RVV oder Trypsin zu Faktor Xa aktiviert werden kann. Ein weiteres Ziel ist es eine pharmazeutische Präparation mit Faktor VIII-Bypass-Aktivität bereitzustellen.

Diese Aufgaben werden erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß ein Faktor X-Analogon zur Verfügung gestellt wird, das eine Substitution zumindest einer der Aminosäuren zwischen Glu226 und Arg234, und gegebenenfalls Ile235 aufweist. Die Position der Aminosäuren ist dabei auf die Numerierung gemäß der in Fig. 1 dargestellten Sequenz bezogen, und zwar beginnend mit Met1 und endend mit Lys488. Die Aminosäure-Substitution in diesem Bereich ist eine neue, nicht-natürlicherweise an dieser Position im Polypeptid vorkommende Erkennungs- bzw. Prozessierungsstelle für Faktor XIa oder einem Derivat davon, ausgenommen eine Sequenz Glu-Arg-Gly-Asp-Asn-Asp-Phe-Thr-Arg/Ile der Aminosäuren 226-234, der normalerweise FX nicht spaltet. Überraschenderweise zeigt das erfindungsgemäße Faktor X Analogon eine mindestens 2-fach, bevorzugterweise mindestens 5-fach, besonders bevorzugt eine mindestens 10-fach gesteigerte Aktivierbarkeit durch Faktor XIa gegenüber dem Faktor X-Analogon gemäß der WO 98/38317 aufweist.

Weiters hat sich überraschenderweise gezeigt, daß das Faktor X-Analogon gemäß vorliegender Erfindung bei einer Antigen-Konzentration von 4-8µg/ml die Gerinnungszeit von Faktor IX oder FVIII-defizientem Plasma effizienter reduzieren kann als >200mU, bevorzugt >500mU, besonders bevorzugt >1000mU Plasma Faktor IX oder FVIII.

Vorzugsweise ist zumindest eine der Aminosäuren 226-230, insbesondere 226-228, substituiert. Besonders bevorzugt ist, wenn möglichst viele der Aminosäuren im Bereich 226-235 einer Spalt-

stelle für Faktor XIa oder einem Derivat davon entsprechen. Die Einführung einer spezifischen Faktor XIa-Spaltsequenz, die zumindest 4, vorteilhafter Weise zumindest 6, Aminosäuren umfaßt, hat sich erfindungsgemäß besonders bewährt.

Die Modifikation ist vorzugsweise so ausgewählt, daß die Prozessierung durch Faktor XIa zu einem dem nativen Faktor Xa entsprechenden Polypeptid führt, das im wesentlichen der natürlich vorkommenden Faktor Xa-Sequenz gleicht und ebenfalls Faktor Xa-Aktivität aufweist.

Um eine optimale Prozessierung zu erreichen, kann es in einzelnen Fällen notwendig sein, zusätzlich die Aminosäure Ile235 auszutauschen. Vorzugsweise sollte die NH<sub>2</sub>-terminale Aminosäure Isoleucin der schweren Kette jedoch nach Aktivierung erhalten bleiben, da dieser Aminosäure bei der Bildung der Substratbindungstasche eine wesentliche Funktion zukommt (Watzke et al. 1995. Molecular Basis of Thrombosis and Hemostasis ed. Katherine High & Harold Roberts). Die erfindungsgemäßen Faktor X-Analoga zeigen einen strukturellen Unterschied, insbesondere auf Aminosäure-Ebene im Vergleich zur nativen Faktor X-Sequenz, besitzen jedoch eine vergleichbare Aktivierbarkeit, wie natürlich vorkommender Faktor X bzw. nach Aktivierung, Faktor Xa-Aktivität.

Die Erfindung stellt dabei Faktor X-Analoga zur Verfügung, die eine Substitution im Aktivierungspeptid in bezug auf die natürlich vorkommende Faktor X-Sequenz und eine veränderte Proteasespezifität aufweisen. Aminosäuresubstitutionen können dabei sein an Position Ile235 (R1), Arg234, Thr233 (R2), Leu232 (R3), Asn231 (R4), Asn230 (R5), Asp229 (R6), Gly228 (R7) und Arg229 (R8) wobei jedoch vorzugsweise Arg234 unverändert bleibt.

Die erfindungsgemäßen Faktor X-Analoga enthalten vorzugsweise eine Faktor X-Sequenz mit Glu226-R8-R7-R6-R5-R4-R3-R2-Arg234-R1, wobei

- a) R1 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Ile, Val, oder Ala

- b) R2 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Thr, Ser oder Asn;
  - c) R3 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Phe, Leu, Arg oder Ile;
  - d) R4 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Asp, Lys, Thr oder Glu;
  - e) R5 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Asn, Ser, Lys, Met, Thr oder Asp;
  - f) R6 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Phe, Thr, Ser, Pro, Leu oder Ile
  - g) R7 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Ser, Gln, Ile, Thr, Asn oder Pro;
- R8 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gln, Ser, His, Tyr oder Glu ist.

Erfindungsgemäß unterscheiden sich bevorzugterweise die Aminosäuren 226-234 um mindestens 4 Aminosäuren von der natürlichen Faktor X-Sequenz, wobei zumindest 3 der Aminosäuresubstitutionen vorzugsweise unmittelbar aufeinanderfolgend sind.

Bevorzugterweise handelt es sich dabei um Aminosäuresequenzen, die den Aminosäuresequenzen des Aktivierungspeptids von Faktor IX entsprechen. Diese Sequenzen können humanen, aber auch tierischen (z.B. murinen, porcinen etc.) Faktor IX Aktivierungspeptid-Bereichen entsprechen.

Bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Faktor X-Analoga sind dabei FX-Analoga, die eine Substitution aufweisen mit:

- a) R1= Val, R2= Thr, R3= Leu, R4= Asp, R5= Asn, R6= Asp, R7= Ser und R8= Gln und durch Faktor XIa oder einem Derivat davon prozessiert wird.
- b) R1= Ile, R2= Thr, R3= Leu, R4= Asp, R5= Asn, R6= Asp, R7= Ser und R8= Gln und durch Faktor XIa oder einem Derivat davon prozessiert wird (Fig. 2).
- c) R1= Val, R2= Thr, R3= Leu, R4= Lys, R5= Ser, R6= Thr, R7= Gln und R8= Ser und durch Faktor XIa oder einem Derivat davon prozessiert wird.

cc cc cc cc cc cc cc cc  
cc cc cc cc cc cc cc cc  
cc cc cc cc cc cc cc cc  
cc cc cc cc cc cc cc cc

- 10 -

d) R1= Ile, R2= Thr, R3= Leu, R4= Lys, R5= Ser, R6= Thr, R7= Gln und R8= Ser und durch Faktor XIa oder einem Derivat davon prozessiert wird.

Weitere bevorzugte Varianten können sich aus dem Austausch von einer oder zwei weiteren Aminosäuren der obigen Moleküle a) -d) ergeben, für die die Spaltbarkeit mittels Faktor XIa mit den erfindungsgemäß zur Verfügung gestellten Assays belegt worden ist.

Die Modifikationen können dabei beispielsweise durch gerichtete *in vitro* Mutagenese oder PCR oder andere aus dem Stand der Technik bekannten gentechnischen Methoden durchgeführt werden, die dazu geeignet sind, spezifisch eine DNA-Sequenz zu verändern, um gezielt Aminosäurenaustausche auszuführen.

Die Aktivierung des erfindungsgemäßen Faktor X-Analogon zu einem nativen Faktor Xa bzw. einem Faktor Xa-Analogon erfolgt gemäß der vorliegenden Erfindung durch Faktor XIa oder einem Derivat davon.

Eine der Schwierigkeiten bei der Herstellung von aktivem Faktor Xa ist seine Instabilität, da durch Autokatalyse neben Faktor Xaα auch Faktor Xaβ und andere, gegebenenfalls inaktive, Intermediate entstehen.

Zur Herstellung von im wesentlichen intakten, aktiven Faktor X/Xa bzw. Faktor X/Xa-ähnlichen Molekülen wäre es daher wünschenswert, nur solche Proteine zu erhalten, die zu stabilen Endprodukten führen.

Es ist bekannt, daß eine bevorzugte Spaltstelle für die Prozessierung von Faktor Xaα (Fxaα) zu Faktor Xaβ (Fxaβ) zwischen Arg469/Gly470 liegt. Aufgrund von Untersuchungen von Eby et al. (1992. Blood. Vol. 80, Suppl 1, 1214) wird neben einem prominenten carboxyterminalen Peptid (Aminosäurereste 476-487) von Faktor X ein weiteres kürzeres Peptid (Aminosäurereste 474 bis 477) gefunden, das durch Autokatalyse von Faktor Xaα entsteht. Um eine gezielte Prozessierung von intaktem Faktor X zu im wesentlichen aktivem Faktor Xa zu focussieren, ohne dabei inaktive Pro-

zessierungs-Intermediate zu erhalten, weisen die erfindungsgemäßen Faktor X-Analoga weitere Modifikationen auf.

Das erfindungsgemäße Faktor X-Analogon weist daher gemäß einer besonderen Ausführungsform eine weitere Modifikation im C-terminalen Bereich der Faktor X-Aminosäuresequenz auf.

Gemäß einer Ausführungsform weist ein Faktor X-Analogon der oben beschriebenen Art ein intaktes  $\beta$ -Peptid ( $\text{Fx}\alpha$ ) auf. Das erfindungsgemäße Faktor X-Analogon besitzt dabei insbesondere eine Modifikation im Bereich der C-terminalen  $\beta$ -Peptidspaltstelle, die verhindert, daß nach Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa eine Abspaltung des  $\beta$ -Peptids von Faktor X erfolgt. Dadurch wird ein Faktor Xa-Molekül erhalten, das bis zu 100% als intaktes Faktor Xa $\alpha$ -Molekül isoliert werden kann.

Die Modifikation kann eine Mutation, Deletion oder Insertion im Bereich der Faktor X-Aminosäuresequenz zwischen Aminosäureposition Arg469 und Ser476 und gegebenenfalls von Lys 370 sein. Bevorzugt ist jedoch eine Aminosäuresubstitution, bei der durch den Aminosäureaustausch eine die Struktur und damit gegebenenfalls die Funktion und Aktivität des Proteins beeinflussende Faltung des Polypeptides nicht erfolgen kann.

Gemäß einer Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen Faktor X-Analoga einen Austausch einer der Aminosäuren an Position Arg469 und/oder Gly470, wobei Arg469 vorzugsweise gegen Lys, His oder Ile und Gly470 vorzugsweise gegen Ser, Ala, Val oder Thr ausgetauscht ist.

Die erfindungsgemäßen Faktor X-Analoga können neben einer Mutation an Position Arg469 und/oder Gly470 eine weitere Mutation an Position Lys370 und/oder Lys475 und/oder Ser476 aufweisen.

Durch eine Aminosäuresubstitution an einer dieser Positionen wird eine Prozessierung von Faktor Xa $\alpha$  zu Faktor Xa $\beta$  bzw. Faktor Xa $\gamma$  vermieden, da die natürlicherweise vorkommende(n) Prozessierungssequenz(en) derart modifiziert ist (sind), daß eine gegebenenfalls autokatalytische Abspaltung des Carboxy-terminalen Peptids nicht mehr erfolgen kann.

Gemäß einer anderen Ausführungsform weist das erfindungsgemäße Faktor X-Analogon eine Deletion des carboxyterminalen  $\beta$ -Peptids (FX $\beta$ ) auf. Ein solches Faktor X-Analogon kann hergestellt werden, indem eine cDNA kodierend für ein Faktor X-Analogon in einem rekombinanten Expressionssystem exprimiert wird, wobei nur die Sequenzen kloniert werden, die für die Aminosäuren Met1 bis Arg469 kodieren.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform weist das erfindungsgemäße Faktor X-Analogon ein Translationsstoppsignal im C-terminalen Bereich der Faktor X-Sequenz auf. Das Translationsstoppsignal ist dabei vorzugsweise an einer Position, die einer nach natürlicher Prozessierung entstehenden C-terminalen Aminosäure folgt. Das Translationsstoppsignal ist daher vorzugsweise an Position der Aminosäure 470 der Faktor X-Sequenz, damit das endständige Arg469 des Faktor X $\alpha\beta$  erhalten bleibt. Dazu wird das für die Aminosäure Gly470 kodierende Kodon GGC gegen TAA, TAG oder TGA substituiert.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Faktor X-Analoga, die durch Behandlung mit Faktor XIa oder einem Derivat davon *in vivo* und *in vitro* zu nativem Faktor Xa bzw. einem Faktor Xa-Analogon aktiviert werden, also die aktivierten Faktor X-Analoga. Abhängig vom Faktor X-Analogon, das eingesetzt und aktiviert wird, wird ein dem nativem Faktor Xa entsprechendes und im wesentlichen identes Polypeptid erhalten bzw. ein Polypeptid, das zwar Faktor Xa-Aktivität aufweist, jedoch in bezug auf die native Faktor Xa-Sequenz Modifikationen aufweist, die jedoch nicht die biologische Aktivität beeinträchtigen. Bei Aktivierung der erfindungsgemäßen Faktor X-Analogen, die die Substitution im Bereich des Aktivierungspeptids in der Sequenz des Aktivierungspeptids aufweisen, werden ausschließlich dem nativem Faktor Xa-Molekül entsprechende Polypeptide erhalten. Weist ein solches Faktor X-Analogon gegebenenfalls zusätzlich ein Translationsstoppsignal im C-terminalen Bereich des  $\beta$ -Peptids auf, so werden Faktor X $\alpha\beta$  homologe Moleküle gewonnen. Wird jedoch ein Faktor X-Analogon eingesetzt, das Modifikation(en) innerhalb der  $\beta$ -Peptidsequenz aufweist, die dazu führt(en), daß das  $\beta$ -Peptid

nicht abgespalten wird, so wird ein Faktor Xa $\alpha$ -Analogon mit einem Aminosäureaustausch im C-Terminus des Moleküls erhalten.

Die erfindungsgemäßen Faktor X-Analoga weisen ausschließlich Modifikationen auf, die die Spezifität für die Aktivierbarkeit ändern und nicht die Aktivität nachteilig beeinflussen. Es werden daher in jedem Fall biologisch und funktionell aktive Faktor Xa-Moleküle bzw. Faktor Xa-Analoga gewonnen.

Die Aktivierung *in vivo* und *in vitro* kann durch Faktor XIa oder einem Derivat davon erfolgen. Ein Faktor XIa-Derivat kann dabei ein von Faktor XIa abgeleitetes Polypeptid oder Protein sein, daß sich vom nativen Faktor XIa etwa in seiner Länge unterscheidet (z.B. trunkierte Formen) oder aber durch Aminosäure-Substitution erhalten ist. Wesentlich ist stets, daß auch das Faktor XIa-Derivat stets die für Faktor XIa charakteristische spezifische Proteaseaktivität aufweist.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform werden Faktor X-Analoga bereitgestellt, die vorzugsweise in gereinigter Form als einzelkettige Moleküle vorliegen. Das einzelkettige Faktor X-Molekül zeichnet sich durch seine hohe Stabilität und molekulare Integrität aus. Bisher konnte ein einzelkettiges Faktor X-Molekül nicht in gereinigter Form isoliert werden, da es sehr rasch in die zweikettige Form prozessiert wird (Fair et al. 1984. Blood 64:194-204). Die rekombinanten einzelkettigen Faktor X-Analoga können durch spezifische Prozessierung in die zweikettige Faktor X-Form prozessiert und anschließend zu Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon aktiviert werden. Dies kann dadurch erfolgen, daß das einzelkettige Faktor X-Analoga mit Furin in Kontakt gebracht und prozessiert wird und anschließend durch Faktor XIa oder einem Derivat aktiviert wird.

Zweikettiges Faktor X-Analogon kann zu Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon aktiviert werden. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß ein Faktor X-Analogon, das durch die erfindungsgemäße Substitution in Bereich des Aktivierungspeptids eine Faktor XIa Spaltstelle aufweist, in einer rekombinanten Zelle als einzelkettiges Molekül exprimiert und isoliert und anschließend



durch in Kontakt bringen mit Furin prozessiert wird und dann durch Faktor XIa oder einem Derivat davon in ein aktiviertes Faktor Xa-Molekül gespalten wird.

Ein als zweikettiges Molekül aus einer Zellkultur isoliertes Faktor X-Analogon kann direkt mit Faktor XIa oder einem Derivat davon behandelt werden.

Ein derart erhaltener Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon weist aufgrund der selektiven und gerichteten Prozessierungsreaktion eine hohe Stabilität und strukturelle Integrität auf und ist insbesondere frei von inaktiven Faktor X/Xa-Analogon-Intermediaten und autoproteolytischen Abbauprodukten. Weiters ist das erfindungsgemäße Faktor X-Analogon besonders gut durch Faktor XIa oder einem Derivat davon aktivierbar, gegenüber den Faktor X-Analogen aus der WO 98/38317 ist die Aktivierbarkeit mindestens 2-fach, bevorzugt mindestens 5-fach, besonders bevorzugt mindestens 10-fach gesteigert. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß die erfindungsgemäßen Konstrukte die verbesserte Aktivierbarkeit vor allem dadurch erhalten, daß zumindest 4, vorzugsweise mindestens 6 der Aminosäuren 226-235 verschieden von den im natürlichen Faktor X-Molekül vorkommenden Aminosäuren sind und vorteilhafter Weise zumindest 3 der ausgetauschten Aminosäuren aufeinander abfolgen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die rekombinante DNA kodierend für die erfindungsgemäßen Faktor X-Analogue. Die rekombinante DNA resultiert nach deren Expression in einer geeigneten Wirtszelle in einem Faktor X-Analogon mit einer Aminosäuresequenz entsprechend dem humanen Faktor X, außer daß es eine Aminosäure-Substitution aufweist, die die Prozessierungsspezifität und Prozessierungsprodukte beeinflusst. Die biologische Koagulans-Aktivität wird aber in keinsten Weise negativ beeinflusst, überraschenderweise kommt es häufig sogar zu einer Steigerung der Aktivität.

Gemäß einem weiteren Aspekt werden auch transformierte Zellen enthaltend die rekombinante DNA zur Verfügung gestellt.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine Präparation enthaltend ein gereinigtes Faktor X-Analogon oder ein Vorläuferprotein davon, das die erfindungsgemäße Aminosäure-Substitution im Bereich der natürlicherweise vorkommenden Faktor Xa-Aktivierungsstelle aufweist. Die Substitution im Bereich der Aktivierungsspaltstelle ist eine neue, nicht-natürlicherweise an dieser Position im Polypeptid vorkommende Erkennungs- bzw. Spaltstelle für Faktor XIa bzw. einem Derivat davon, der das Polypeptid normalerweise nicht an dieser Stelle prozessiert. Die Präparation kann dabei eine gereinigte Präparation von Faktor X-Analogen sein, wobei die Polypeptide aus einem Zellkultursystem entweder nach Isolierung aus dem Zellkulturüberstand oder aus einem Extrakt einer Zellkultur erhalten werden. Ein aus einem Zellkultursystem vorgereinigtes rekombinantes Faktor X-Analogon kann über aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren weiter gereinigt werden. Dazu eignen sich insbesondere chromatographische Verfahren, wie Gelfiltration, Ionenaustauscher- oder Affinitätschromatographie.

Gemäß einer Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Präparation das Faktor X-Analogon vorzugsweise als einzelkettiges Molekül in isolierter Form. Eine derartige Präparation wird dadurch hergestellt, daß ein durch rekombinante Herstellung gewonnenes Faktor X-Analogon als einzelkettiges Molekül aus einem Zellsystem, vorzugsweise einer Zellkultur von aus Endoprotease-defizienten Zellen, isoliert wird.

Gemäß einem besonderen Aspekt enthält die Präparation einzelkettiges Faktor X-Analogon mit einer Modifikation, die nach Prozessierung durch Furin eine Aktivierung zu Faktor Xa durch Faktor XIa oder einem Derivat davon *in vitro* erlaubt. Die Aktivierung erfolgt dabei durch In-Kontakt-bringen des Faktor X-Analogons mit den Proteasen, wobei eine Spaltung in die reife Faktor X-Form und durch die Modifikation eine Abspaltung des Aktivierungspeptids erfolgt und Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon entsteht.

In der erfindungsgemäßen Präparation kann das Faktor X-Analogon entweder als Faktor X $\alpha$  (FX $\alpha$ ) oder mit einer Deletion des  $\beta$ -Peptids vorliegen.

Die Präparation enthält insbesondere Faktor X-Analogon in enzymatisch inaktiver Form mit einer Reinheit von mindestens 80%, vorzugsweise 90%, besonders bevorzugt von 95% und enthält keine inaktiven, proteolytischen Intermediate von Faktor X/Xa-Analogon.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Präparation das Faktor X-Analogon vorzugsweise als zweikettiges Molekül in isolierter Form. Dazu wird beispielsweise ein durch rekombinante Herstellung als einzelkettiges Molekül aus einem Zellsystem gewonnenes Faktor X-Analogon *in vitro*, also außerhalb der Zelle, durch Furin, in die zweikettige Form gespalten. Dies kann dadurch erfolgen, daß die Protease direkt mit dem Kulturüberstand der Faktor X-Analogon exprimierenden Klone gemischt wird, entweder durch Mischen der gereinigten Protease oder eines Zellkulturüberstandes einer die Protease in rekombinanter Form exprimierenden Zellkultur, oder durch Co-Kultivierung von Faktor X-Analogon und Protease-exprimierenden Klonen.

Gemäß einer besonderen Ausführung enthält die Präparation enthaltend das gereinigte, einzelkettige oder zweikettige Faktor X-Analogon einen physiologisch akzeptablen Träger und ist gegebenenfalls als pharmazeutisches Präparat formuliert. Die Formulierung kann in an sich üblicher Weise erfolgen und mit einem Puffer enthaltend Salze, wie NaCl, CaCl<sub>2</sub>, und Aminosäuren, wie Glycin und/oder Lysin, bei einem pH im Bereich von 6 bis 8 gemischt und als pharmazeutisches Präparat formuliert sein. Die gereinigte Präparation enthaltend Faktor X-Analogon kann als fertige Lösung, Lyophilisat oder tiefgefroren bis zum Endgebrauch als lagerfähiges Produkt bereitgestellt werden. Vorzugsweise erfolgt die Lagerung der Präparation in lyophilisierter Form und wird mit einer entsprechenden Rekonstitutionslösung in eine optisch klare Lösung gelöst.

Die Präparation gemäß der vorliegende Erfindung kann jedoch auch als Flüssigpräparat bzw. in flüssig-tiefgefrorener Form zur Verfügung gestellt werden.

Die erfindungsgemäße Präparation ist besonders stabil, d.h. sie kann auch in gelöster Form über längere Zeit vor der Applikation stehen gelassen werden. Es hat sich gezeigt, daß die erfindungsgemäße Präparation für mehrere Stunden bis Tage keinerlei Aktivitätsverlust zeigt.

Die erfindungsgemäße Präparation kann in einer geeigneten Vorrichtung, vorzugsweise einer Applikationsvorrichtung, in Kombination mit Faktor XIa oder einem Derivat davon, vorliegen.

Die erfindungsgemäße Präparation, enthaltend ein Faktor X-Analogon in Kombination mit Faktor XIa oder einem Derivat davon, der in der Lage ist, das Faktor X-Analogon zu Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon zu aktivieren, kann als Kombinationspräparat bereitgestellt werden, bestehend aus einem Behälter enthaltend an einen Träger immobilisierten Faktor XIa, gegebenenfalls in Form einer Mini-Säule oder einer mit einer Protease bestückten Spritze und einem Behälter enthaltend die pharmazeutische Präparation mit Faktor X-Analogon. Zur Aktivierung des Faktor X-Analogons wird die Faktor X-Analogon-haltige Lösung beispielsweise über die immobilisierte Protease gedrückt. Die Faktor X-Analogon haltige Lösung ist dabei während der Lagerung des Präparates vorzugsweise von der Protease räumlich getrennt. Die erfindungsgemäße Präparation kann im gleichen Behälter wie die Protease sein, wobei die Komponenten jedoch durch eine impermeable Trennwand, die bei etwaigem Gebrauch leicht zu entfernen ist, räumlich getrennt sind. Die Lösungen können auch in eigenen Behältern aufbewahrt werden und erst kurz vor Anwendung miteinander in Kontakt gebracht werden.

Die Aktivierung von Faktor X-Analogon zu Faktor Xa kann kurz vor dem direkten Gebrauch, also vor der Applikation am Patienten erfolgen. Die Aktivierung kann durch in Kontakt-bringen mit einer immobilisierten Protease oder durch Mischen von Lösungen enthaltend, einerseits eine Protease und Faktor X-Analogon anderer-

seits erfolgen. Es ist daher möglich, die beiden Komponenten getrennt voneinander in Lösung zu halten und durch eine geeignete Infusionsvorrichtung, bei der die Komponenten während des Durchlaufs in Kontakt kommen, zu mischen und so zu Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon zu aktivieren. Dem Patienten wird so ein Gemisch von Faktor Xa und einer weiteren Serinprotease, die die Aktivierung bewirkt hat, verabreicht. Hierbei ist insbesondere auf die Dosierung zu achten, da durch die zusätzliche Gabe einer Serinprotease auch endogener Faktor X aktiviert wird und damit die Gerinnungszeit verkürzt sein kann.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird die pharmazeutische Präparation in einer geeigneten Vorrichtung, vorzugsweise einer Applikationsvorrichtung, entweder in flüssig-gefrorener oder lyophilisierter Form zur Verfügung gestellt. Eine geeignete Applikationsvorrichtung kann dabei ein gemäß der AT 366 916 oder der AT 382 783 beschriebener Doppelkammerspritzenkörper sein.

Gemäß einem besonders bevorzugten Aspekt der Erfindung enthält die Präparation ein Faktor X-Analogon mit einer Modifikation, die die Aktivierung von Faktor X-Analogon zu einem Faktor Xa *in vivo* erlaubt. Die Faktor X-Analoga der erfindungsgemäßen Präparation weisen insbesondere eine Modifikation auf, die eine Erkennungsstelle/Spaltstelle für Faktor XIa oder ein Derivat davon darstellt und werden durch diese Protease *in vivo* zu nativem Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon gespalten. Dadurch kann die erfindungsgemäße Präparation bei der Blutstillung sowohl bei Patienten mit Defizienzen des Faktor IX als auch des Faktor VIII eingesetzt werden, als auch bei Faktor VIII-Inhibitor-Patienten.

Die erfindungsgemäße Präparation kann als pharmazeutische Präparation mit Faktor Xa-Aktivität als Einkomponenten-Präparat oder in Kombination mit anderen Faktoren als Mehrkomponenten-Präparat zur Verfügung gestellt werden.

Vor der Aufbereitung in eine pharmazeutische Präparation wird das gereinigte Protein den üblichen Qualitätskontrollen unterzogen und in eine therapeutisch verabreichbare Form gebracht. Insbesondere wird bei der rekombinanten Herstellung das gereinigte

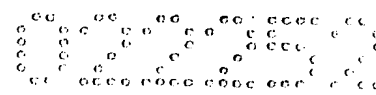
Präparat auf Abwesenheit von zellulären und vom Expressionsvektor stammenden Nukleinsäuren getestet, vorzugsweise gemäß einem Verfahren wie es in der EP 0 714 987 beschrieben ist.

Da prinzipiell jedes biologische Material mit infektiösen Keimen kontaminiert sein kann, wird zur Herstellung eines sicheren Präparates die Präparation gegebenenfalls zur Inaktivierung bzw. Abreicherung von Viren behandelt.

Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine Präparation, enthaltend Faktor Xa-Analogon mit hoher Stabilität und struktureller Integrität, zur Verfügung gestellt, die insbesondere frei ist von inaktiven Faktor X/Xa-Analogon-Intermediaten und autoproteolytischen Abbauprodukten und dadurch erhältlich ist, daß ein Faktor X-Analogon der oben beschriebenen Art aktiviert und zu einer entsprechenden Präparation zubereitet wird.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung einer Präparation der oben beschriebenen Art zur Herstellung eines Arzneimittels. Ein Arzneimittel, enthaltend ein erfindungsgemäßes Faktor X-Analogon bzw. Faktor Xa-Analogon, eignet sich insbesondere zur Behandlung von Patienten mit Störungen der Blutgerinnung, wie etwa Hämophilie-Patienten oder Hämophilie-Inhibitor-Patienten, und insbesondere als Präparat mit Faktor VIII-Bypass-Aktivität.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung einer Nukleinsäure enthaltend die kodierenden Sequenzen der erfindungsgemäßen Faktor X-Analogen zur Herstellung eines Arzneimittels. Dabei kann die Nukleinsäure, sofern sie geeignete Expressionskontrollsequenzen enthält, als nackte Nukleinsäure appliziert werden, in einem rekombinanten Expressionsvektor integriert sein oder an einen Träger, entweder ein Phospholipid oder ein virales Partikel gebunden sein. Die Nukleinsäure kann dabei zur Herstellung eines Arzneimittels verwendet werden, das sich insbesondere zur Behandlung von Patienten mit Störungen der Blutgerinnung, wie etwa Hämophilie-Patienten oder Hämophilie-



Inhibitor-Patienten eignet. Ein Einsatz der Nukleinsäure in der Gentherapie ist ebenfalls denkbar.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Faktor X-Analogen und eine Präparation enthaltend ein erfindungsgemäßes Faktor X-Analogon. Dazu wird eine für ein Faktor X-Analogon kodierende Sequenz in ein geeignetes Expressionssystem eingebracht und entsprechende Zellen, vorzugsweise permanente Zelllinien, mit der rekombinanten DNA transfiziert. Die Zellen werden unter optimalen Bedingungen für die Genexpression kultiviert und Faktor X-Analoga entweder aus dem Extrakt einer Zellkultur oder dem Zellkulturüberstand isoliert. Die Reinigung des rekombinanten Moleküls kann durch alle bekannten chromatographischen Verfahren, wie Anionen- oder Kationenaustauscher-, Affinitäts- oder Immunaффinitätschromatographie, oder einer Kombination davon, weiter gereinigt werden.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Faktor X-Analogen wird die komplette für Faktor X kodierende cDNA in einen Expressionsvektor kloniert. Dies erfolgt entsprechend den allgemein bekannten Klonierungstechniken. Die für Faktor X kodierende Nukleotidsequenz wird anschließend derart modifiziert, daß die kodierende Sequenz im Bereich des Aktivierungspeptids und gegebenenfalls auch im Bereich des C-terminalen  $\beta$ -Peptids derart verändert wird, daß ein Faktor X-Molekül der oben beschriebenen Art hergestellt werden kann. Dies erfolgt durch aus dem Stand der Technik bekannte gentechnische Methoden, wie spezifische gerichtete *in vitro*-Mutagenese, oder Deletion von Sequenzen, beispielsweise durch Restriktionsverdau durch Endonukleasen und Insertion anderer, veränderter Sequenzen, oder durch PCR. Die so hergestellten Faktor X-Mutanten werden dann in ein für die rekombinante Expression geeignetes Expressionssystem inseriert und exprimiert.

Die erfindungsgemäßen Faktor X-Analoga können ebenfalls durch chemische Synthese hergestellt werden.

Die Faktor X-Analoga werden vorzugsweise durch rekombinante Expression hergestellt. Die gentechnische Herstellung kann mit allen gängigen Expressionssystemen, wie z.B. permanenten Zelllinien

oder viralen Expressionssystemen, erfolgen. Die permanenten Zelllinien werden hergestellt durch stabile Integration der Fremd-DNA in das Wirtszellchromosom von z.B. Vero, MRC5, CHO, BHK, 293, Sk-Hep1, insbesondere Leber- und Nierenzellen, oder durch einen episomalen Vektor, abgeleitet von z.B. Papilloma Virus. Virale Expressionssysteme, wie beispielsweise Vaccinia Virus, Baculovirus oder retrovirale Systeme können ebenfalls eingesetzt werden. Als Zelllinien werden allgemein Vero, MRC5, CHO, BHK, 293, Sk-Hep1, Drüsen-, Leber- und Nierenzellen eingesetzt. Als eukaryontische Expressionssysteme können auch Hefen, endogene Drüsen (z.B. Drüsen transgener Tiere) und andere Zelltypen verwendet werden. Natürlich können auch transgene Tiere zur Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide oder Derivaten davon verwendet werden. Zur Expression der rekombinanten Proteine haben sich im speziellen CHO-DHFR- Zellen bewährt (Urlaub et al. 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220).

Zur rekombinanten Herstellung der erfindungsgemäßen Faktor X-Analogue können auch prokaryontische Expressionssysteme eingesetzt werden. Hierzu eignen sich insbesondere Systeme, die eine Expression in *E. coli* oder *B. subtilis* erlauben.

Die Faktor X-Analogue werden in den entsprechenden Expressionssystemen unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors expri-miert. Im Fall der Expression in Eukaryonten eignen sich dazu alle bekannten Promotoren, wie SV40-, CMV-, RSV-, HSV-, EBV-,  $\beta$ -Actin-, hGH oder induzierbare Promotoren wie z.B. hsp- oder Metallothionein-Promotor. Vorzugsweise werden die Faktor X-Analogue unter Kontrolle des  $\beta$ -Actin-Promotors in CHO-DHFR-Zellen expri-miert.

Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung umfaßt das Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Präparation die Schritte: Bereitstellen einer für ein Faktor X-Analogon kodierende DNA, Transformation einer Zelle mit der rekombinanten DNA, Expression des Faktor X-Analogons, gegebenenfalls in Gegenwart einer Protease, Isolieren des Faktor X-Analogon und gegebenenfalls Reinigung über ein chromatographisches Verfahren.



Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens wird das Faktor X-Analogon als zweikettiges Molekül isoliert.

Dazu wird Faktor X-Analogon in einer Zelle exprimiert, die eine Prozessierung von pro-Faktor X-Analogon in zweikettigen Faktor X-Analogon erlaubt.

Das so erhaltene zweikettige Faktor X-Analogon kann anschließend isoliert, gereinigt und bis zur weiteren Verwendung, wie oben beschrieben, stabil gelagert werden.

Gemäß einer Ausführungsform erfolgt die Aktivierung durch einen chromatographischen Schritt, bei dem die Protease an einen Träger immobilisiert ist. Gereinigtes zweikettiges Faktor X-Analogon wird dazu über eine Matrix, an die die Protease gebunden ist, geleitet und aus dem Eluat, gereinigter Faktor Xa isoliert.

Gemäß einer anderen Ausführungsform werden die Komponenten gemischt und die Protease selektiv aus dem Gemisch entfernt.

Es ist natürlich auch eine Kombination von Prozessierung von einzelkettigem pro-Faktor X-Analogon in die zweikettige Faktor X-Analogon-Form und Aktivierung zu Faktor Xa in einem einzigen Verfahren möglich.

Die Reaktionsbedingungen für Prozessierungsreaktion(en) und die Aktivierung können ohne weiteres vom Fachmann je nach Versuchsanordnung der gegebenen Rahmenbedingungen optimiert werden. Dabei ist für die Kontaktdauer die Fließgeschwindigkeit der vorliegenden Reaktanden von besonderer Bedeutung. Diese sollte zwischen 0,01 ml/min und 1 ml/min liegen. Als weitere Parameter sind Temperatur, pH-Wert und Elutionsbedingungen von Bedeutung. Nach dem Durchlauf kann aktivierter Faktor Xa gegebenenfalls über selektive Chromatographie weiter gereinigt werden. Die Durchführung des Verfahrens mit jeweils an einen Träger gebundener Protease ist deshalb von besonderem Vorteil, da die Reaktionsanordnung durch Verwendung eines Trägers, vorzugsweise von

Chromatographiesäulen, einen zusätzlichen Reinigungsschritt ermöglicht.

Gemäß einem weiteren Aspekt zur Herstellung eines Faktor X-Analogon wird Faktor X-Analogon als einzelkettiges Molekül isoliert. Dazu wird das Faktor X-Analogon in einer Zelle exprimiert, in der die Spaltung der leichten und schweren Kette von Faktor X bzw. eines Faktor X-Analogons nicht erfolgen kann. Eine der wesentlichen für die Spaltung von Faktor X in leichte und schwere Kette verantwortlichen Proteasen ist Furin. Aus einer solchen Endoprotease-defizienten-Mutantenzelle kann Faktor X-Analogon als einzelkettiges Molekül isoliert werden. Ein derart isoliertes und gegebenenfalls gereinigtes Faktor X-Analogon wird anschließend mit Furin in Kontakt gebracht, unter Bedingungen unter denen einzelkettiges Faktor X-Analogon in die zweikettige Faktor X-Form gespalten wird. Erfindungsgemäße Faktor X-Analoga, die eine Substitution im Bereich des Aktivierungspeptids aufweisen, die eine Spaltung durch Faktor XIa ermöglicht, können anschließend durch dieses Verfahren gegebenenfalls direkt durch in Kontakt-Bringen mit Faktor XIa oder einem Derivat davon zu Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon aktiviert werden.

Gemäß einem Aspekt der Erfindung wird durch das Verfahren eine Präparation enthaltend aktiven Faktor Xa bzw. ein aktives Faktor Xa-Analogon dadurch erhalten, daß, ein wie oben beschrieben hergestelltes, Faktor X-Analogon einem Aktivierungsschritt unterzogen wird und das aktivierte Polypeptid zu einer gereinigten Präparation, die gegebenenfalls als pharmazeutische Zusammensetzung formuliert ist, weiterverarbeitet wird.

Mit den erfindungsgemäßen Faktor X-Analogen, die durch einen oben beschriebenen Prozess zu Faktor Xa aktiviert werden, wird gereinigter Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon mit hoher Stabilität und struktureller Integrität und insbesondere frei von inaktiven Faktor X/Xa-Intermediaten, gewonnen.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und der Zeichnungsfiguren, auf die sie jedoch nicht beschränkt sein soll, näher erläutert.

Es zeigen:

Fig. 1: Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Faktor X; Fig. 2: Schematische Darstellung des Faktor X Analogons mit modifizierter Protease-Schnittstelle im Bereich des Aktivierungspeptids; Fig. 3: Westernblot-Analyse des rFaktor X exprimiert in CHO Zellen; und Fig. 4: Westernblot-Analyse nach in vitro Aktivierung des Faktor X-Analogons mit Faktor XIa

Beispiele:

#### **Beispiel 1:**

**Konstruktion und Expression von rekombinantem Faktor X Wildtyp (rFX) und Faktor X/FXIa(Q-R/I) Analogen**

##### **a. Herstellung des rFX Expressionsvektors phAct-rFX**

Die cDNA von FX wurde aus einer humanen Leber Lambda-cDNA-Bank, wie von Messier et al. beschrieben (1991, Gene 99:291-294), isoliert. Aus einem positiven Klon wurde mittels PCR mit dem Oligonukleotid #2911 (5'-ATTACTCGAGAAGCTTACCATGGGGCGCCCACTG-3') als 5'-Primer und dem Oligonukleotid #2912 (5'-ATTACAATTGCTGCAGGGATCCAC-3') als 3'-Primer ein DNA-Fragment amplifiziert, das die 1,467kB FX-kodierende Sequenz sowie 39bp der 3' nicht translatierten Region, flankiert von einer XhoI-Schnittstelle am 5'-Ende und einer MfeI-Schnittstelle am 3'-Ende enthält. Zusätzlich wurde durch den Primer #2911 die Sequenz ACC vor ATG des FX eingebaut, so daß eine optimale Kozak-Translationsinitiations-Sequenz entsteht. Anschließend wurde dieses PCR-Fragment als XhoI/MfeI-Fragment in den mit SalI und EcoRI geschnittenen Expressionsvektor phAct kloniert. Der Expressionsvektor phAct umfaßt etwa 3,3kb des Promoters, 78bp 5'UTR sowie das etwa 1kb große Intron des humanen beta-Actin-Gens (Fischer et al. FEBS Lett. 351:345-348, 1994), eine multiple Klonierungsschnittstelle und die SV40-Polyadenylierungsstelle. Das resultierende Expressionsplasmid wurde mit phAct-rFX bezeichnet.

##### **b. Herstellung des phact-rFX/FXIa(Q-R/I) Expressionsplasids**

Zur Herstellung von rekombinanten FX/FXIa(Q-R/I)-Analogen wurde die Aminosäure Sequenz von Position 227 bis 234 (Arg-Gly-Asp-Asn-Asn-Leu-Thr-Arg/Ile), die der Aktivierung des FX in FXa dient, durch den intrinsischen Tenase Komplex FIXa/FVIIIa bzw. durch den extrinsische FVIIa/TF, durch die Sequenz Gln-Ser-Phe-Asn-Asp-Phe-Thr-Arg/Ile (in Folge als (Q-R/I) bezeichnet), spezifisch durch den Gerinnungsfaktor XIa aktiviert, ersetzt (Figur 2). Q-R wurde in Anlehnung an die zweite FXIa Schnittstelle, wie sie in dessen 'natürlichem' Substrat FIX vorkommt, erstellt. Das Expressionsplasmid für dieses rFX-Analogon ist vom Plasmid phAct/rFX abgeleitet. Für Klonierungszwecke wurde das HindIII-NaeI-DNA-Fragment aus dem phAct-rFX Expressionsplasmid, das die FX-kodierende Region von Position +1 bis +1116 umfaßt, in die HindIII-SmaI-Restriktionschnittstellen von Plasmid pUC19 inseriert. Das resultierende Plasmid wurde mit pUC/FX bezeichnet. Dadurch konnte die FX-Sequenz von Nukleotid 508 bis 705, die den Aminosäuren 160 bis 235 entspricht, aus dem pUC/FX-Plasmid über Bsp120I und BstXI Restriktionsschnitte entfernt und durch ein mutiertes FX-DNA-Fragment ersetzt werden. Das mutierte DNA-Fragment enthält statt der FIXa/FVIIIa- und FVIIa/TF-Stelle die FX-fremde Spaltstelle für FXIa und wird mittels PCR hergestellt. Als Vorlage für die PCR dient das Plasmid phAct/rFX. Zur Herstellung der Gln-Ser-Phe-Asn-Asp-Phe-Thr-Arg/Ile (Q-R/I) Spaltstelle werden als 5'-Primer das Oligonukleotid #4211 (5'-GGCAAGGCCTGCATTCCCACA-3') und als 3'-Primer das Oligonukleotid #5039 benützt (5'-GCGCTCCACGATCCTGGTGAAGTCATTAAAGCTTTGCTCAGGCTGCGTCTGGTT-3') benützt. Daher werden die Aminosäuren Arg, Gly, Asp, Asn, und Leu an Position 227, 228, 229, 231 und 232 in Gln, Ser, Phe, Asp und Phe ausgetauscht. Das PCR-Produkt wird mit Bsp120I und BstXI nachgeschnitten und in das mit Bsp120I/BstXI geöffnete pUC-FX-Plasmid eingesetzt. Anschließend wird über HindIII/AgeI das DNA-Fragment, das die neue Spaltstelle enthält, zurück in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen phAct-FX eingefügt. Das resultierende Plasmid wird phAct-FX/FXIa(Q-R/I) bezeichnet.

### c. Expression von rFX und des rFX/FXIa(Q-R/I)-Analogons in CHO Zellen.

Zur Etablierung stabiler rFX/FXIa-exprimierender Zelllinien werden in dhfr-defizienten CHO-Zellen das Expressionsplasmid phAct-rfX bzw. phAct-rfX/fXIa(Q-R/I) mit dem Selektionsmarker pSV-dhfr co-transfiziert (Fischer et al. FEBs Lett. 351:345-348, 1994). Für alle weiteren Expressions- und Funktionsanalysen werden die Zellkulturen nach vollständigem Medienwechsel mit serumfreiem Selektionsmedium in Anwesenheit von 10µg/ml Vitamin K 24 Stunden lang inkubiert. Die Expression von rfX in den resultierenden Zellklonen wird anhand der Antigenmenge (ELISA, Asserachrom, Boehringer Mannheim) nachgewiesen und das rekombinante Protein anschließend mit SDS-PAGE charakterisiert (Figur 3). Wie im Western Blot erkennbar, liegen sowohl die rFX- Wildtyp als auch die rFX/FXIa(Q-R/I)-Moleküle in Form einer leichten Kette (LC) von etwa 22kD und einer schweren Kette (HC) von ca. 50kD vor, die den plasmatischen Faktor X-Formen entsprechen. Zusätzlich ist eine 75kD große Proteinbande zu erkennen. Das 75kD Protein entspricht dem einzelkettigen (SC) FX-Molekül, dessen Präsenz bereits in den Überständen FX-transfizierter CHO-Zellen (Wolf et al., J.Biol. Chem. 266:13729-13730, 1991) sowie in humanem Plasma (Fair et al., Blood 64:194-204, 1984) beschrieben wurde.

#### Beispiel 2:

#### In vitro Aktivierung der rFX/FXIa(Q-R/I)-Moleküle mittels Faktor XIa

Um die Spaltbarkeit der neu eingefügten Aktivierungsstellen mittels Faktor XIa nachzuweisen, werden die Zellkulturüberstände, in Anwesenheit von 5mM CaCl<sub>2</sub>, mit gereinigtem Faktor XIa versetzt. Aliquots der Reaktionsansätze werden sowohl vor Inkubation, als auch nach verschiedenen Inkubationszeiten bei 37°C, mittels Western Blot-Analyse auf Spaltung getestet (Figur 4). Der Nachweis der rFX-Moleküle erfolgt mittels eines polyklonalen anti-humanen FX-Antikörpers. Als positive Kontrolle dient gereinigter Plasma Faktor IX (Stago), der das natürliche Substrat für FXIa darstellt. Um in einander entsprechenden Bedingungen zu arbeiten, wird der FIX vor Verwendung in Zellkulturüberständen

nicht transfizierter CHO-Zellen verdünnt. Die Umsetzung des FIX in die aktivierten Formen (FIXa und FIXb) zeigt, daß FXIa seine homologe Schnittstelle in FIX in Zellkulturüberständen spalten kann. Der Reaktionsansatz mit rFX-Wildtyp dient als negative Kontrolle, da dieses Molekül keine FXIa-Spaltstelle enthält und daher nicht spezifisch durch FXIa erkannt und gespalten werden sollte. Nach Inkubation mit FXIa wird für rFX, im Vergleich mit rFX in Abwesenheit von FXIa, wie erwartet keine Änderung im Proteinmuster sichtbar.

Im Gegensatz dazu treten im Reaktionsansatz von FXIa mit rFX/FXIa(Q-R/I) als Substrat nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C in Anwesenheit von  $\text{CaCl}_2$ , Proteinbanden von ca. 36kD und 32kD auf, die den aktivierten alpha und beta Formen (aHCa und bHCa) der schweren Kette des FX ähnlich sind. In Abwesenheit von FXIa treten diese gespaltenen Moleküle nicht auf. Die Anwesenheit einer bHCa-ähnlichen Form, die durch die autokatalytische Abspaltung C-terminaler Aminosäuren der schweren Kette von aHCa entsteht, läßt auf die Funktionalität der generierten aktivierten rFXa-Moleküle schließen. Diese Ergebnisse zeigen, daß durch den Austausch der natürlich vorkommenden Aktivierungssequenz in FX in eine Aktivierungsspaltstelle für FXIa, rFX-Analogen Moleküle erstellt werden können die durch FXIa aktiviert und in FXa ähnliche Moleküle umgesetzt werden können.

Die beschriebene Methode kann für alle weiteren Faktor X-Analoge herangezogen werden, um sie hinsichtlich der erfindungsgemäßen Eigenschaften zu testen.

### Beispiel 3:

#### a. Aktivität des rFX/FXIa(Q-R/I)-Analogons im Vergleich zu rFX Wildtyp in FIX-defizientem Plasma.

Um die Funktionalität des rFX-Analogen zu testen, wird FIX-defizientes Plasma mit CHO-rFX/FXIa(Q-R/I) Zellkulturüberstand, versetzt und die Gerinnungszeit nach Aktivierung der intrinsischen Gerinnungskaskade gemessen (Tabelle 1). Dafür werden 50µl durch Ultrafiltration ankonzentrierter Überstand, 50µl FIX-defizientes Plasma und 50µl DAPPTIN (Baxter AG) gemischt. Nach

einer Inkubation von 4 Minuten bei 37°C wird die Reaktion mit 50µl, auf 37°C vorgewärmtem, 25mM CaCl<sub>2</sub> gestartet. Die Gerinnungszeit wird im Koagulometer gemessen (Amelung, KC10A). Die Aktivität in mU FIX wird mittels einer Eichgeraden, die mit plasmatischen FIX erstellt wird, ermittelt. Die mit den rFX-Analogen erreichten Gerinnungszeiten werden entsprechend als mU FIX-Äquivalente angegeben. Als Kontrolle dienen Zellkulturüberstände von rFX-Wildtyp exprimierenden CHO-Zellen (CHO-rFX) sowie Zellkulturüberstände nicht transfizierter CHO-Zellen (CHO neg.). Um unspezifische Effekte auszuschließen, und auf Zellkulturbedingungen beruhende experimentelle Variationen zu berücksichtigen, werden für jedes Konstrukt 7 bis 10 verschiedene Zellkulturüberstände von Zellen, für die gleiche Wachstumsstadien und ähnliche Expressionsraten vorliegen, getestet.

Zellkulturüberstände von CHO-rfX und CHO neg. ergeben Gerinnungszeiten im Bereich des Verdünnungspuffers, in dem die Standards und Proben verdünnt werden, und werden damit als '<1,56' mU FIX-Äquivalent angegeben (kleinster auswertbarer Wert in Gerinnungstest, bedingt durch die Eichgerade).

Dagegen werden für Überstände von CHO-rFX/FXIa(Q-R/I)-Zellen mit Konzentrationen des Analogons von 4,1 bis 7,7µg/ml signifikant kürzere Gerinnungszeiten ermittelt als jene, die mit 200mU plasmatischen FIX bestimmt wurden und werden daher als '>200' mU FIX-Äquivalent angegeben.

Diese Ergebnisse zeigen, daß durch den Austausch der 8 C-terminalen Aminosäuren des FX-Aktivierungspeptids durch die 8 C-terminalen Aminosäuren des Aktivierungspeptids von Faktor IX ein rFX-Analogon-Molekül geschaffen wurde, das nach Aktivierung der intrinsischen Gerinnungskaskade zu signifikanter Gerinnung eines Faktor IX-defizienten Plasma führt.

**b. Bestimmung der funktionellen Aktivität der rFX/FXIa(Q-R/I)-Analogons in FIX- und FVIII- defizienten Plasmen nach Vorbehandlung der Zellkulturüberstände mit Serinprotease- Inhibitoren.**

Um ausschließen zu können, daß die mit den rFX/FXIa(Q-R/I)-Analogen erreichten Gerinnungszeiten nicht aufgrund der Anwesen-

heit von Spuren bereits aktivierter rFX-Moleküle in den Zellkulturüberstände hervorgerufen werden, sondern erst durch die Umsetzung der rFX-Analogen in rFXa nach Aktivierung der intrinsischen Gerinnungskaskade durch DAPPTIN erfolgt, werden alle Überstände vor Benützung mit einem Serinprotease-Inhibitor (1mM Pefabloc, Boehringer Mannheim), der aktivierte Serinproteasen permanent inaktiviert, versetzt. Überschüssiger Inhibitor, der die Gerinnung nach DAPPTIN-Aktivierung hemmen würde, wird anschließend durch Dialyse gegen Tris pH 7,4, NaCl 50mM, Tween 0,01% entfernt. So vorbehandelte Überstände werden anschließend im Gerinnungstest eingesetzt.

Die Konzentration an Serinprotease-Inhibitor wurde so ausgewählt, daß die Mengen an FXa, die zu einer ähnlichen Gerinnung führen wie die unbehandelten rFX/FXIa(Q-R/I)- Zellkulturüberstände, vollständig inhibiert wird (Tabelle 2). Die Ergebnisse dieses Vorexperiments zeigen, daß bei einer Inhibitor Konzentration von 1mM auch Fxa-Mengen vollständig inaktiviert werden können, die weit kürzere Gerinnungszeiten in FIX-defizientem Plasma aufweisen, als die mit den rFX/FXIa(Q-R/I)-Analogen erzielten (Vergleich mit Tabelle 1).

Die Funktionalität der so vorbehandelten Überstände wird sowohl im FIX- als auch im FVIII-Gerinnungstest gemessen (Tabelle 3). Der FVIII-Gerinnungstest wird analog zum FIX-Gerinnungstest durchgeführt mit dem Unterschied, daß FVIII-defizientes statt FIX-defizientes Plasma benützt wird, die Inkubation vor dem Start mit  $\text{CaCl}_2$  3 Minuten beträgt und die Eichkurve mit plasmatischen FVIII erstellt wird.

Überstände von CHO-rFX-Zellen liegen sowohl in FIX- als auch im FVIII-defizientem Plasma unter der Auswertungsgrenze (1,56mU). Ebenso wird keine Verkürzung der Gerinnungszeit mit CHO neg. Überstand hervorgerufen, auch wenn dieser vor Inhibitor-Behandlung mit 1mU FXa versetzt wurde. Diese Kontrollen zeigen, daß auch wenn im Falle bereits voraktivierten FX im Zellkulturüberstand dieser durch den Inhibitor inaktiviert würde, sowie daß die Gerinnung nicht von möglicherweise vorhandenen CHO-spezifischen Proteasen vermittelt wird.



Trotz Inhibitor-Vorbehandlung werden in den CHO-rFX/FXIa(Q-R/I)-Überständen keine signifikant veränderte Meßwerte -verglichen mit unbehandelten Überständen- in FIX bzw. in FVIII- Gerinnungstests beobachtet. Diese Experimente zeigen, daß rekombinante FX-Analagon-Moleküle, die eine FIX- Aktivierungspaltstelle für den FXIa tragen, nach Aktivierung der intrinsischen Gerinnungskaskade zu signifikanter Gerinnung von FIX- und FVIII-defizienten Plasmen führen.

Zusammengefaßt wurde gezeigt, daß diese rekombinanten FX/FXIa(Q-R/I)-analogen Moleküle Eigenschaften aufweisen, die sie als erfolgsversprechende Kandidaten für die Herstellung therapeutischer Präparate ausweisen, die für die Behandlung von unter Hämophilie oder Hämophilie mit inhibitorischen Antikörper leidenden Patienten eingesetzt werden können.

Tabelle 1: Funktionelle Aktivität der rFX/FXIa(Q-R/I)-Moleküle in FIX-defizientem Plasma.

Probe	Antigen $\mu\text{g/ml}$	mU FIX Äquivalent	Gerinnungszeit in Sekunden
rFX/FXIa(Q-R/I)			
sup1	6,3	>200	46,5
sup2	4,4	>200	47,7
sup3	6,6	>200	46,4
sup4	4,8	>200	43,2
sup5	4,1	>200	45,2
sup6	6,4	>200	43,1
sup7	6,6	>200	43,1
sup8	4,3	>200	45,2
sup9	5,7	>200	39,4
sup10	7,7	>200	44,2
rFXwt			
sup1	2,1	<1,56	107,8
sup2	3,1	<1,56	97,8
sup3	1,6	3	84,7
sup4	2,4	<1,56	90,4
sup5	3,2	<1,56	92,4
sup6	4,4	<1,56	96,2
sup7	6,7	<1,56	92,7
CHO neg.		<1,56	179,7
Plasma FIX	1*		50,7
Plasma FIX	0,5*		54,5
Plasma FIX	0,125*		65,6
Plasma FIX	0,0625*		72,2
Plasma FIX	0,0078*		89,1
Puffer	0		109,7

\* Eingesetzt wurden 200, 100, 25, 12,5 bzw. 1,56 mU plasmatischer FIX. Für die Umrechnung dieser Werte in  $\mu\text{g/ml}$  wurde angenommen, daß 1 Unit FIX ca.  $5\mu\text{g}$  FIX /ml entspricht.

Tabelle 2: Bestimmung der Inaktivierung von FXa durch Vorbehandlung mit Pefabloc und anschließende Dialyse, im FIX- Gerinnungstest

Probe	eingesetzte mU	Gerinnungszeit in Sek.	mU FIX Äquivalent
FXa	5	19,9	>200
FXa	1	32,5	>200
FXa	0,5	45	>200
FXa	0,1	76,1	10
FXa + Inh	5	93,4	1,94
FXa + Inh	1	115,9	<1,56
FXa + Inh	0,5	113,5	<1,56
FXa + Inh	0,1	115,3	<1,56
Plasma	200	52,9	
Plasma	1,56	95,7	
Puffer		114,7	

Tabelle 3: Funktionelle Aktivität von CHO-rFX/FXIa(Q-R/I)- Zellkulturüberständen nach Vorbehandlung mit Pefabloc und Dialyse in FIX- und FVIII-Gerinnungstests.

Probe	Antigen µg/ml	mU FIX Äquivalent	mU FVIII Äquivalent
rFX/FXIa(Q-R/I)			
sup1	6,3	>200	>200
sup2	4,4	100	>200
sup3	6,6	>200	>200
sup4	4,8	167	>200
sup5	4,1	>200	>200
sup6	6,4	>200	>200
sup7	6,6	>200	>200
sup8	4,3	>200	>200
sup9	5,7	>200	>200
sup10	7,7	>200	>200
rFXwt			
sup1	2,1	<1,56	<1,56
sup2	3,1	<1,56	<1,56
sup3	1,6	<1,56	<1,56
sup4	2,4	<1,56	<1,56
sup5	3,2	<1,56	<1,56
sup6	4,4	<1,56	<1,56
sup7	6,7	<1,56	<1,56
CHO neg.		<1,56	<1,56
CHO neg. + FXa		<1,56	<1,56
Plasma FIX (-Inh.-Dial.)*	25mU	25	
Plasma FIX	25mU	4	
Plasma FVIII (-Inh.-Dial.)*	50mU		48
Plasma FVIII (-Inh.-Dial.)*	3,125mU		3

\* Diese Proben wurden unbehandelt (Ohne Zugabe von Serinprotease-Inhibitor und Dialyse) in die Tests eingesetzt.

Ansprüche:

1. Faktor X-Analogon, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Substitution zumindest einer der Aminosäuren zwischen Glu226 und Arg234, und gegebenenfalls Ile235, bezogen auf die Aminosäurennumerierung gemäß Fig. 1, aufweist.
2. Faktor X-Analogon nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Faktor X-Sequenz mit Glu226-R8-R7-R6-R5-R4-R3-R2-Arg234-R1 enthält, wobei
  - a) R1 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Ile, Val, oder Ala
  - b) R2 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Thr, Ser oder Asn;
  - c) R3 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Phe, Leu, Arg oder Ile;
  - d) R4 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Asp, Lys, Thr oder Glu;
  - e) R5 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Asn, Ser, Lys, Met, Thr oder Asp;
  - f) R6 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Phe, Thr, Ser, Pro, Leu oder Ile;
  - g) R7 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Ser, Gln, Ile, Thr, Asn oder Pro;
  - h) R8 eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe Gln, Ser, His, Tyr oder Glu ist.
3. Faktor X-Analogon dadurch gekennzeichnet, daß es eine Modifikation im Bereich der Aminosäuren Gln227-Ser228-Phe229-Asn230-Asp231-Phe232-Thr233, und gegebenenfalls Ile235 der Faktor X-Sequenz, bezogen auf die Aminosäurennumerierung gemäß Fig. 1, enthält.
4. Faktor X-Analogon dadurch gekennzeichnet, daß es eine Modifikation im Bereich der Aminosäuren Ser227-Gln228-Thr229-Ser230-Lys231-Leu232-Thr233, und gegebenenfalls Ile235 der Faktor X-Sequenz, bezogen auf die Aminosäurennumerierung gemäß Fig. 1, enthält.

5. Faktor X-Analogen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation eine Prozessierungsstelle für Faktor XIa oder einem Derivat davon darstellt.
6. Faktor X-Analogen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es eine weitere Modifikation im Bereich der C-terminalen Faktor X-Aminosäuresequenz aufweist.
7. Faktor X-Analogen nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Modifikation im C-terminalen Bereich der  $\beta$ -Peptidspaltstelle aufweist.
8. Faktor X-Analogen nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Substitution im Bereich des Aktivierungspeptids eine Aktivierung des Faktor X-Analogen zu nativem Faktor Xa bzw. einem Faktor X-Analogen *in vivo* erlaubt.
9. Faktor X-Analogen nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation eine Aktivierung von Faktor X-Analogen zu nativem Faktor Xa bzw. einem Faktor Xa-Analogen *in vitro* erlaubt.
10. Faktor X-Analogen nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß es als Faktor X-Analogen mit intaktem  $\beta$ -Peptid vorliegt.
11. Faktor X-Analogen nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß es als zweikettiges Molekül vorliegt.
12. Faktor X-Analogen nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß es als ein C-terminal verkürztes Faktor-Analogen vorliegt.
13. Rekombinante DNA, kodierend für ein Faktor X-Analogen nach einem der Ansprüche 1 bis 12, enthalten in einem Vektor zur rekombinanten Expression des kodierten Proteins.
14. Präparation, enthaltend ein gereinigtes Faktor X-Analogen oder ein Vorläuferprotein davon, mit einer Substitution einer

der Aminosäuren zwischen Glu226 und Arg234, und gegebenenfalls Ile235, bezogen auf die Aminosäurenummerierung gemäß Fig. 1.

15. Präparation nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Substitution eine Spaltstelle für Faktor XIa oder ein Derivat davon darstellt.
16. Präparation nach einem der Ansprüche 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Faktor X-Analogon als  $FX\alpha$  vorliegt.
17. Präparation nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Faktor X-Analogon als C-terminal verkürztes Faktor X-Analogon vorliegt.
18. Präparation nach einem der Ansprüche 14 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß sie Faktor X-Analogon als zweikettiges Molekül in isolierter Form enthält.
19. Präparation nach einem der Ansprüche 14 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein einzelkettiges Faktor X-Analogon in enzymatisch inaktiver Form mit einer Reinheit von mindestens 80%, vorzugsweise 90%, besonders bevorzugt von 95% und keine inaktiven, proteolytischen Intermediate von Faktor X/Xa-Analogon enthält.
20. Präparation nach einem der Ansprüche 14 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie Faktor X-Analogon als einzelkettiges Molekül in isolierter Form enthält.
21. Präparation nach einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Faktor X-Analogon enthält, das eine Modifikation aufweist, die eine Aktivierung von Faktor X-Analogon zu nativem Faktor Xa bzw. einem Faktor Xa-Analogon *in vivo* erlaubt.
22. Präparation nach einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Faktor X-Analogon enthält, das eine Modifikation aufweist, die eine Aktivierung von Faktor X-Analogon zu nativem Faktor Xa bzw. einem Faktor Xa-Analogon *in*

vitro erlaubt.

23. Präparation nach einem der Ansprüche 14 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß sie als pharmazeutisches Präparat formuliert ist.
24. Präparation enthaltend Faktor Xa-Analogon mit hoher Stabilität und struktureller Integrität, die insbesondere frei ist von inaktiven Faktor X/Xa-Analogon-Intermediaten und autoproteolytischen Faktor X-Abbauprodukten erhältlich durch Aktivierung eines Faktor X-Analogons gemäß einem der Ansprüche 1 bis 23.
25. Präparation nach einem der Ansprüche 14 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen physiologisch akzeptablen Träger enthält und in einer lagerstabilen Form vorliegt.
26. Präparation nach einem der Ansprüche 14 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß sie gegebenenfalls als weiteren Bestandteil einen Blutfaktor oder eine aktivierte Form eines Blutfaktors enthält.
27. Präparation nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß sie als weiteren Bestandteil mindestens eine Komponente mit Faktor VIII-Bypass-Aktivität enthält.
28. Präparation nach einem der Ansprüche 14 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß sie als pharmazeutische Zusammensetzung formuliert und gegebenenfalls als Mehrfachkomponentenpräparat vorliegt.
29. Verwendung einer Präparation nach einem der Ansprüche 14 bis 28 zur Herstellung eines Arzneimittels.
30. Verwendung einer rekombinanten DNA nach Anspruch 13 zur Herstellung eines Arzneimittels.
31. Verfahren zur Herstellung einer Präparation enthaltend gereinigtes rekombinantes Faktor X-Analogon mit einer Substitution einer der Aminosäuren zwischen Glu226 und Arg234, und gegebenen-



falls Ile235 bezogen auf die Aminosäurenummerierung gemäß Fig. 1, dadurch gekennzeichnet, daß das durch rekombinante Herstellung gewonnene Faktor X-Analogon isoliert und über ein chromatographisches Verfahren gereinigt wird.

32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß es folgende Schritte umfaßt:

- Bereitstellen einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 13
- Transformation einer geeigneten Zelle
- Expression eines Faktor X-Analogon,
- gegebenenfalls Inkubieren des Faktor X-Analogons mit Faktor XIa oder einem Derivat davon
- Isolieren des Faktor X-Analogons und
- Reinigung des Faktor X-Analogons über ein chromatographisches Verfahren.

33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß das Faktor X-Analogon als zweikettiges Molekül isoliert wird.

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß das zweikettige Faktor X-Analogon mit Faktor XIa oder einem Derivat davon gespalten wird.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß das Faktor X-Analogon als einzelkettiges Molekül isoliert wird.

36. Verfahren nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß einzelkettiges, gegebenenfalls isoliertes Faktor X-Analogon mit Furrin oder einem Derivat prozessiert und anschließend mit Faktor XIa oder einem Derivat davon zu Faktor Xa oder Faktor Xa-Analogon aktiviert wird.

37. Verfahren zur Herstellung einer Präparation enthaltend aktiven Faktor Xa bzw. Faktor Xa-Analogon, dadurch gekennzeichnet, daß ein gemäß einem Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 38 hergestelltes Faktor X-Analogon einem Aktivierungsschritt unterzogen wird.

38. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß gereinigtes Faktor Xa-Analogon oder nativer Faktor Xa mit hoher Stabilität und struktureller Integrität, der insbesondere frei ist von inaktiven Faktor X/Xa Intermediaten, gewonnen wird.

cc cc cc cc cc cc  
c c c c c c c c c c  
c c c c c c c c c c  
c c c c c c c c c c

- 40 -

# Zusammenfassung:

Beschrieben wird ein Faktor X-Analogon, das eine Substitution zumindest einer der Aminosäuren zwischen Glu226 und Arg234, und gegebenenfalls Ile235, bezogen auf die Aminosäurenumerierung gemäß Fig. 1, aufweist, eine Präparation, enthaltend die aktivierte Form des Faktor X-Analogon, sowie Verfahren zur Herstellung dieser Moleküle.

(Fig. 2)

A1377/99-1

Urtext

(-40)

1  
Met Gly Arg Pro Leu His Leu Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Ala Gly Leu Leu Leu  
ATG GGG CGC CCA CTG CAC CTC GTC CTG CTC AGT GCC TCC CTG GCT GGC CTC CTG CTG  
9 18 27 36 45 54

(-4) (-1)

Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn Asn Ile Leu Ala Arg Val Thr Arg  
CTC GGG GAA AGT CTG TTC ATC CGC AGG GAG CAG GCC AAC AAC ATC CTG GCG AGG GTC ACG AGG  
66 75 84 93 102 111 120

(+1)

41  
Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr  
GCC AAT TCC TTT CTT GAA GAG ATG AAG AAA GGA CAC CTC GAA AGA GAG TGC ATG GAA GAG ACC  
129 138 147 156 165 174 183

Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn  
TGC TCA TAC GAA GAG GCC CGC GAG GTC TTT GAG GAC AGC GAC AAG ACG AAT GAA TTC TGG AAT  
192 201 210 219 228 237 246

Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp  
AAA TAC AAA GAT GGC GAC CAG TGT GAG ACC AGT CCT TGC CAG AAC CAG GGC AAA TGT AAA GAC  
255 264 273 282 291 300 309

Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe  
GGC CTC GGG GAA TAC ACC TGC ACC TGT TTA GAA GGA TTC GAA GGC AAA AAC TGT GAA TTA TTC  
318 327 336 345 354 363 372

Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn  
ACA CGG AAG CTC TGC AGC CTG GAC AAC GGG GAC TGT GAC CAG TTC TGC CAC GAG GAA CAG AAC  
381 390 399 408 417 426 435

Ser Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro  
TCT GTG GTG TGC TCC TGC GCC CGC GGG TAC ACC CTG GCT GAC AAC GGC AAG GCC TGC ATT CCC  
444 453 462 471 480 489 498

178 179 180 181 182 183  
Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val Ala Gln Ala  
ACA GGG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ACC CTG GAA CCG AGG AAG AGG TCA GTG GCC CAG GCC  
507 516 525 534 543 552 561

Thr Ser Ser Ser Gly Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu  
ACC AGC AGC AGC GGG GAG GCC CCT GAC AGC ATC ACA TGG AAG CCA TAT GAT GCA GCC GAC CTG  
570 579 588 597 606 615 624

R6  
229  
Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp  
GAC CCC ACC GAG AAC CCC TTC GAC CTG CTT GAC TTC AAC CAG ACG CAG CCT GAG AGG GGC GAC  
633 642 651 660 669 678 687

R5 R4 R3 R2

R1

234 235

Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala  
AAC AAC CTC ACC AGG ATC GTG GGA GGC CAG GAA TGC AAG GAC GGG GAG TGT CCC TGG CAG GCC  
696 705 714 723 732 741 750

Fig. 1-1

Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile  
 CTG CTC ATC AAT GAG GAA AAC GAG GGT TTC TGT GGT GGA ACT ATT CTG AGC GAG TTC TAC ATC  
 759 768 777 786 795 804 813

Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn  
 CTA ACG GCA GCC CAC TGT CTC TAC CAA GCC AAG AGA TTC AAG GTG AGG GTA GGG GAC CGG AAC  
 822 831 840 849 858 867 876

Thr Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn Arg  
 ACG GAG CAG GAG GAG GGC GGT GAG GCG GTG CAC GAG GTG GAG GTG GTC ATC AAG CAC AAC CGG  
 885 894 903 912 921 930 939

Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe  
 TTC ACA AAG GAG ACC TAT GAC TTC GAC ATC GCC GTG CTC CGG CTC AAG ACC CCC ATC ACC TTC  
 948 957 966 975 984 993 1002

Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr  
 CGC ATG AAC GTG GCG OCT GCC TGC CTC CCC GAG CGT GAC TGG GCC GAG TCC ACG CTG ATG ACG  
 1011 1020 1029 1038 1047 1056 1065

Gln Lys Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg  
 CAG AAG ACG GGG ATT GTG AGC GGC TTC GGG CGC ACC CAC GAG AAG GGC CGG CAG TCC ACC AGG  
 1074 1083 1092 1101 1110 1119 1128

Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile  
 CTC AAG ATG CTG GAG GTG CCC TAC GTG GAC CGC AAC AGC TGC AAG CTG TCC AGC AGC TTC ATC  
 1137 1146 1155 1164 1173 1182 1191

Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp  
 ATC ACC CAG AAC ATG TTC TGT GCC GGC TAC GAC ACC AAG CAG GAG GAT GCC TGC CAG GGG GAC  
 1200 1209 1218 1227 1236 1245 1254

Ser Gly Gly Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp  
 AGC GGG GGC CCG CAC GTC ACC CGC TTC AAG GAC ACC TAC TTC GTG ACA GGC ATC GTC AGC TGG  
 1263 1272 1281 1290 1299 1308 1317

Gly Glu Ser Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys  
 GGA GAG AGC TGT GCC CGT AAG GGG AAG TAC GGG ATC TAC ACC AAG GTC ACC GCC TTC CTC AAG  
 1326 1335 1344 1353 1362 1371 1380

Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu Val  
 TGG ATC GAC AGG TCC ATG AAA ACC AGG GGC TTG CCC AAG GCC AAG AGC CAT GCC CCG GAG GTC  
 1389 1398 1407 1416 1425 1434 1443

488  
 Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys TER  
 ATA ACG TCC TCT CCA TTA AAG TGA  
 1452 1461 1467

Pra-/Propeptid  
 'Connecting' Tripeptid  
 Aktivierungs-Peptid

Fig. 1-2

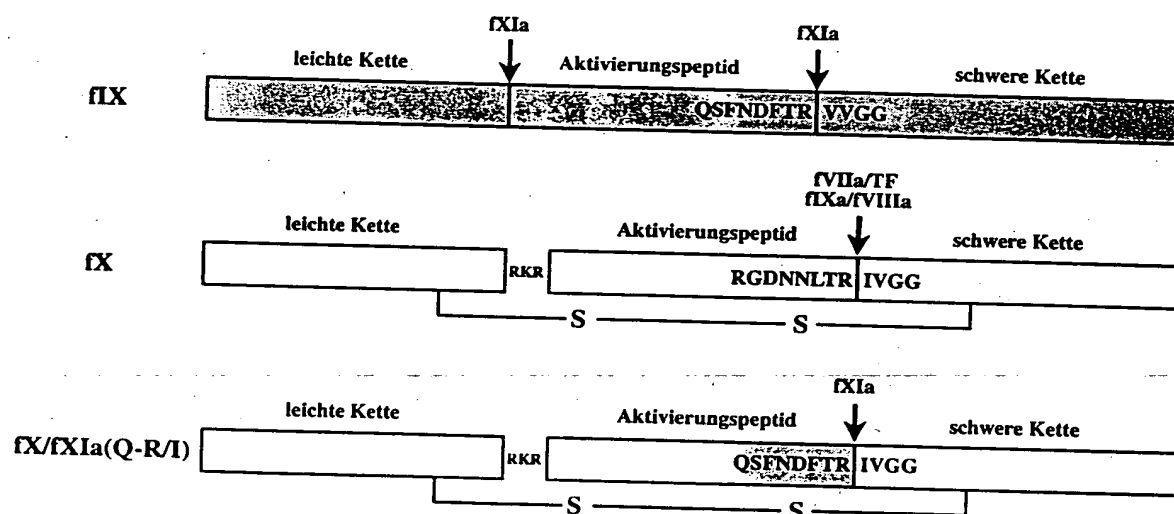


Fig. 2

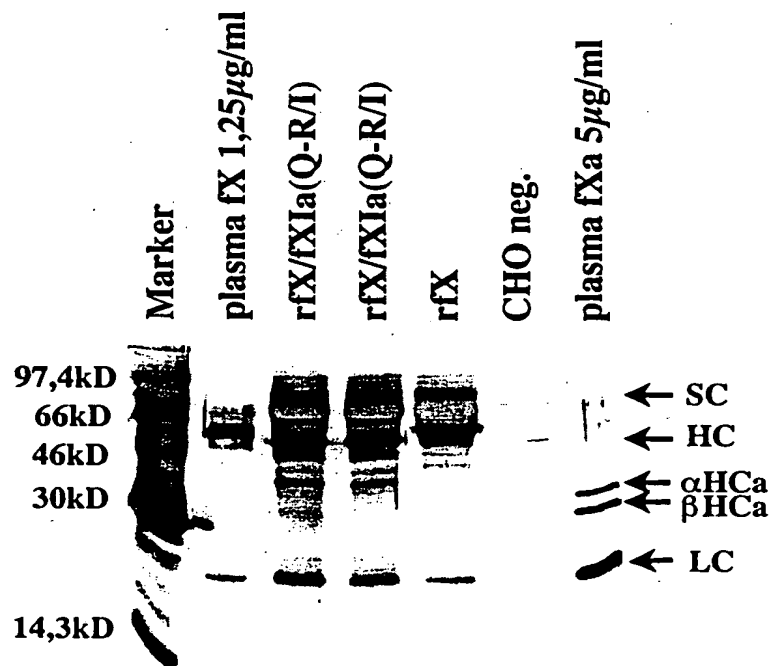


Fig. 3

# In vitro Aktivierung mit Faktor XIa

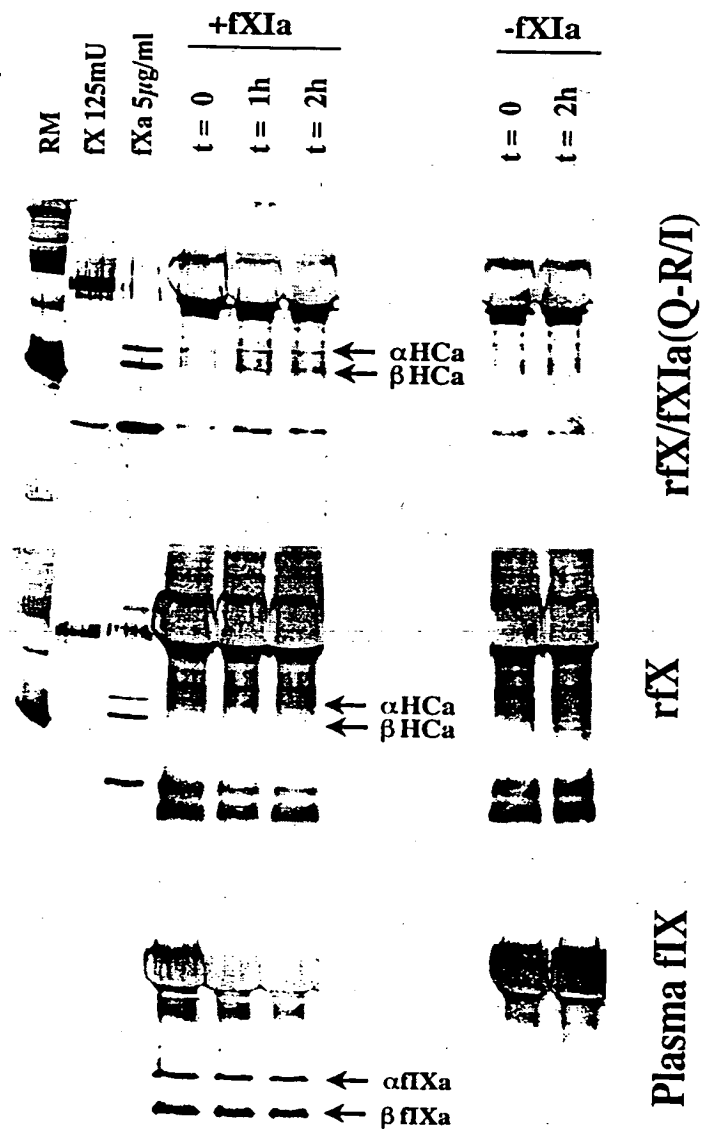


Fig. 4